烟夜蛾组织蛋白酶 B 酶原基因的克隆、序列分析和原核表达

赵艳艳，刘建兵，罗梅浩*，郭线茹，原国辉
（河南农业大学植物保护学院，郑州 450002）

摘要：利用反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)技术从烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（Guenée)雌虫卵巢中扩增得到了组织蛋白酶 B 酶原基因(*cathepsin B*，*CB*)cDNA 片段，将其克隆至 pMD19-T 载体。测序结果表明，该片段长度为 1 017 bp，含有组织蛋白酶 B 酶原基因完整开放阅读框架(ORF)(GenBank 登录号：EF154237)。序列分析结果显示：烟夜蛾组织蛋白酶 B(HassCB)编码 338 个氨基酸残基，预测 N-末端含有长度为 21 个氨基酸残基的信号肽序列；去除信号肽序列后，预测成熟蛋白分子量为 35.5 kDa，等电点为 5.96。氨基酸序列比对结果表明，HassCB 与其他昆虫的组织蛋白酶 B 酶原氨基酸序列有较高的一致性。将去除信号肽序列的 *HassCB*（*HassCBa*)重组到表达载体 pGEX-4T-1 中，并转入原核细胞中表达，SDS-PAGE 和 Western 印迹分析表明：该基因能在大肠杆菌 BL21 中表达，电泳检测到一条大约 61 kDa 的目的条带，与预测的融合蛋白分子量相符。用该基因制备多克隆抗体并测得该抗体对重组表达的 HassCBa 的效价为 1∶51 200。通过免疫印迹检测证实，此抗体既能识别重组表达的 HassCBa，又能识别烟夜蛾卵巢匀浆液中的 HassCB。

关键词：烟夜蛾；组织蛋白酶 B；基因克隆；序列分析；原核表达；免疫印迹
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)11-1121-08

Cloning，sequence analysis and prokaryotic expression of cathepsin B gene from *Helicoverpa assulta*（Guenée）（Lepidoptera：Noctuidae）

ZHAO Yan-Yan，LIU Jian-Bing，LUO Mei-Hao*，GUO Xian-Ru，YUAN Guo-Hui（College of Plant Protection，Henan Agricultural University，Zhengzhou 450002，China）

Abstract：The cathepsin B cDNA from ovary of *Helicoverpa assulta*（Guenée）was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction（RT-PCR）. The results of cloning and sequencing showed that the full-length open reading frame（ORF）of *HassCB* is 1 017 bp（registered with GenBank accession no. EF154237），encoding 338 amino acid residues，and the predicted N-terminus hydrophobic region contains 21 amino acid residues displaying the characteristic features of a signal peptide. The predicted molecular weight（MW）and isoelectric point（pI）are 35.5 kDa and 5.96，respectively. The *HassCBa* gene without signal peptide was then constructed into the expression vector pGEX-4T-1 for expression in prokaryotic cells. The SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the *HassCB* was expressed in *Escherichia coli* BL21，and the expressed product has the MW of 61 kDa，nearly equal to the predicted. Furthermore，the mice were immunized with recombinant HassCB，and the results indicated that the antibody liter was 1∶51 200 against the recombinant HassCBa. Importantly，the immunoblotting result showed that the antibodies could identify HassCB both recombinant and from natural ovary of *H. assulta*.

Key words：*Helicoverpa assulta*；cathepsin B；gene cloning；sequence analysis；prokaryotic expression；immunoblotting

---

基金项目：国家烟草专卖局科技攻关项目(110200101003B)
作者简介：赵艳艳，女，1981 年生，河南漯河人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生态学，E-mail：zhaoyanyan9621@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：luomeihao88@163.com
收稿日期 Received：2008-05-27；接受日期 Accepted：2008-09-30

蛋白酶是催化蛋白质水解的所有酶类的总称，参与生命活动中多种生理、病理性反应。蛋白酶可分为内肽酶和外肽酶两类。根据作用位点的催化基团不同，又将内肽酶分为：半胱氨酸蛋白酶（如组织蛋白酶 B）、天冬氨酸蛋白酶（如组织蛋白酶 D）、丝氨酸蛋白酶（如组织蛋白酶 A）和金属蛋白酶四大类（Bond and Butler，1987；张志宏等，2000）。组织蛋白酶 B（cathepsin B，CB）易被巯基试剂抑制，所以又称巯基酶（Felleisen and klinkert，1990），具有喜酸性、可耐受 1% 十二烷基硫酸钠（SDS）、还原性电泳条件和广谱蛋白酶活性等特性，可以降解血红蛋白、血清蛋白、卵黄磷蛋白、层粘蛋白、纤维连接蛋白和Ⅳ型胶原等细胞外基质成分，从而破坏一系列组织屏障（Berquin and Sloane，1996；童菊芳等，2002；杜欣军等，2004）。

组织蛋白酶 B 广泛存在于细菌、病毒、原生动物、植物、昆虫和哺乳动物中。在昆虫中的报道如：埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 卵中含有组织蛋白酶 B（Cho *et al*.，1999），棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 成虫脂肪体、卵巢、卵中也含有组织蛋白酶 B（徐夏莲等，2001）。在大部分昆虫如棉铃虫、埃及伊蚊、柞蚕 *Antheraea pernyi*、蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini* 中，组织蛋白酶 B 参与胚胎发育中卵黄蛋白降解，为胚胎发育提供必要的营养物质氨基酸（赵小凡等，1998；Kestemont *et al*.，1999），若该酶活性被抑制，就会引起昆虫体内某些必需氨基酸的缺乏，扰乱昆虫的正常代谢甚至导致死亡。在昆虫胚胎发育早期，营养物质分解代谢是主要的生物化学过程之一，这一时期抑制卵内蛋白酶活性，可以终止其胚胎发育，进而杀灭虫卵。因此，组织蛋白酶 B 的研究对开发杀卵剂或胚胎发育抑制剂具有重要意义。

烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（Guenée）是世界动物区系中的东洋、古北、澳洲、非洲区共有种，属于世界性害虫，在我国各省区均有分布（郭线茹等，2000）。烟夜蛾可为害烟草、辣椒等多种作物。目前对烟夜蛾的防治主要还是采用化学防治，而化学农药所带来的环境污染和害虫抗药性等问题日益严重。为了解决这个问题，人们纷纷从基因水平上探索新的防治方法，如利用基因枪或农杆菌介导等技术已经成功地把 15 种来源不同的蛋白酶抑制剂的 cDNA 克隆到了玉米、水稻、小麦等植物中去，获得了大量对昆虫具有明显抗性的转基因植株（Christeller *et al*.，2002；Telang *et al*.，2003）。已发现多种蛋白酶抑制剂对昆虫生长发育有一定的抑制作用，如 E-64 和亮肽素（leupeptin）可抑制柞蚕组织蛋白酶 B；从家蚕血淋巴中分离得到两种形式的抑制因子 BCPIα 和 β，可有效抑制蛋白酶 B 和 L；大豆中发现的半胱氨酸蛋白酶抑制因子 soyacystatin N，可以增加黄瓜十一星叶甲 *Diabrotica undecimpunetata howardi*（Barber）幼虫的死亡率，并能降低其生长速率；豇豆胰蛋白酶抑制因子基因可通过抑制幼虫消化道蛋白酶而控制害虫；以棉铃虫组织蛋白酶 B 为酶源，从大豆中分离纯化到了一种对 HCB 有抑制活性的蛋白酶抑制因子 HCB-SoyI，其用于控制棉铃虫的可能途径是通过雌成虫取食进入虫体，抑制棉铃虫成虫体内 HCB 的活性，影响卵巢发育和胚胎发育，从而达到杀虫的效果（Zhao and Wang，1996；Yamamoto *et al*.，1999；Liu *et al*.，2004；Ahn *et al*.，2004；张新昌等，2005）。本研究对烟夜蛾组织蛋白酶 B 基因（*HassCB*）cDNA 进行了扩增、克隆和序列分析，并对其原核表达和抗体进行了研究，以期为进一步研究该基因的功能并开发出组织蛋白酶抑制剂从而研制出烟夜蛾杀卵剂和（或）胚胎发育抑制剂等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫：烟夜蛾在河南农业大学昆虫实验室饲料，饲养温度为 27 ± 1℃，湿度为 65% ~ 85%，光周期 16L∶8D。成虫羽化后第 3 d 将雌蛾卵巢取出，立即放在液氮中冷冻保存备用。

1.1.2 菌种及质粒：pMD19-T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司，大肠杆菌 JM109 和 BL21（DE3）菌株以及质粒 pGEX-4T-1 均为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂及工具酶：总 RNA 抽提试剂 RNAiso Reagent、用于 RT-PCR 的 One Step RNA PCR Kit、质粒小样快速抽提试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ、蛋白质分子量标准皆购自 TaKaRa 公司，辣根过氧化物酶底物 DAB 以及鼠抗 GST 单抗购自 BBI 公司，辣根过氧化物酶标记的二抗购自华美生物工程公司，X-gal（5-溴-4-氯-3-吲哚-D-半乳糖苷）、IPTG（异丙基-1-硫代-β-D-半乳糖苷）、丙烯酰胺、N，N′-甲叉双丙烯酰胺试剂由 Sangon 公司生产，本研究其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 卵巢总 RNA 的提取：将用液氮保存的烟夜蛾雌蛾卵巢 1 g，放入无 RNAase 的 1.5 mL 离心管

中，加入 1.0 mL 的 RNAiso Reagent，匀浆后按照使用说明提取总 RNA。

1.2.2 引物设计：根据棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原基因序列(GenBank 登录号：AF222728)设计并合成引物(由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)：

HassCBP1：5′- AGGATCC ATGGCCGCTTCGCGT-3′(正向引物)

HassCBP2：5′- actcgag CTAATATTCAACGAACAT-3′(反向引物)

HassCBP3： 5′- AGGATCC ATGGTGCAGAATCCGCTC-3′(正向引物)

其中 HassCBP1 和 HassCBP2 用于 *HassCB* 基因完整 ORF 的扩增；HassCBP3 为基因特异性引物，其与 HassCBP2 引物配对用于扩增编码 HassCB 成熟蛋白的基因。HassCBP1 和 HassCBP3 引物序列下划线部分为 *Bam*H Ⅰ 酶切位点，HassCBP1 引物序列下划线部分为 *Xho* Ⅰ 酶切位点。

1.2.3 RT-PCR：反应体系为：上述提取的总 RNA 样品 3 μL，正向引物和反向引物(100 μmol/L)各 2 μL，10 × Buffer 5 μL，dNTP mixture 5 μL，$MgCl_2$(25 mmol/L)10 μL，RNAse Inhibitor 1 μL，AMV RTase XL 1 μL，AMV-Optimized Taq 1 μL，补充 RNAse Free dH_2O 至 50 μL。反应条件为：首先 50℃反转录 30 min，94℃变性 2 min 后，接着进行 34 轮循环，循环条件为：94℃ 1 min，54℃ 1 min，72℃ 3 min，最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增完毕后用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，并回收目的片段。

1.2.4 PCR 产物的克隆和鉴定：按照使用说明将回收的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接，转化到大肠杆菌 JM109 中进行蓝白斑筛选，随机挑选白色菌落，培养过夜后，利用 TaKaRa 公司的质粒小样快速抽提试剂盒提取质粒，然后用 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 进行双酶切鉴定出阳性重组克隆 pMD/*HassCB*。

1.2.5 序列测定和分析：序列测定由宝生物工程(大连)有限公司完成。利用生物信息学在线工具对序列进行分析。信号肽分析网站：http://www.Cbs.dtu.dk/services/SignalP；蛋白质的分子量、等电点预测网站：http://www.expasy.ch/。利用 EBI 中的 Clustal W 和 Genedoc 软件对序列进行编辑比对；采用 DNAman 构建进化树。

1.2.6 去除信号肽序列的烟夜蛾 *HassCBa* 原核表达载体的构建：以阳性克隆 pMD/*HassCB* 质粒为模板，利用引物 HassCBP3 和 HassCBP2 进行 PCR 扩增，将目的片段亚克隆至 pMD19-T 载体中，酶切和 PCR 鉴定出阳性克隆 pMD/*HassCBa*；将 pMD/*HassCBa* 的双酶切产物经 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后，回收大小约为 960 bp 左右的片段，与经同样双酶切的原核表达载体 pGEX-4T-1 用 T4 DNA 连接酶连接，连接条件 16℃过夜；将连接产物转化至大肠杆菌 JM109 中，酶切和 PCR 初步鉴定后，测序鉴定出阳性克隆 pGEX-4T-1/*HassCBa*。

1.2.7 外源基因的诱导表达：将 pGEX/*HassCBa* 质粒导入大肠杆菌 BL21 后，在 IPTG 诱导下进行表达。具体步骤参照刘晓光等(2006)。

1.2.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 印迹分析：首先将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到硝酸纤维素膜上，然后用封闭液(PBST + 5%脱脂奶粉)封闭过夜，再与鼠抗 GST 单抗室温反应 1.5 h，用 PBST 洗膜 3 次后，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:500)，室温反应 1.5 h 后洗膜 3 次，最后将硝酸纤维素膜置于含有二氨基联苯胺(DAB)的显色液中显色至条带清晰，将膜放入蒸馏水中终止显色反应(Sambrook *et al*.，1989)。

1.2.9 融合蛋白可溶性检测：取 1.2.7 诱导培养的菌液，4℃ 12 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。每 300 μL 培养物细胞沉淀悬于 150 μL PBS。加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL，冰上放置 30 min。用针筒将 30 μL 0.2%的 Triton X-100 注入粘的细胞裂解物中，剧烈振荡数次混匀。4℃振荡温育 15 min。5 000 r/min 离心 20 min，去除不溶性细胞碎片。将上清和沉淀分别处理后进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.10 去掉信号肽的 HassCBa 抗体的制备：表达产物经 SDS-PAGE 电泳后，将凝胶用预冷的 0.25 mmol/L KCl，1 mmol/L DTT 溶液浸泡 5 min，重蒸水冲洗，再置于预冷的重蒸水中(含 1 mmol/L DTT)1 h，切下含目的条带的凝胶，按 1:1(w/v)加入 PBS 缓冲液(0.14 mol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，1.5 mmol/L KH_2PO_4，8.1 mmol/L Na_2HPO_4)，于冰浴中研磨。用 PBS 缓冲液适当稀释后，加入等体积的福氏不完全佐剂(1.5 g 羊毛脂 + 8 mL 石蜡油)进行乳化。采用肌肉注射的方法免疫小鼠，共免疫 3 次。免疫小鼠的工作由郑州博赛生物技术公司协助完成。

1.2.11 HassCBa 抗体的检测：取烟夜蛾雌性成虫，冰浴中分离出卵巢，以 Buffer A(0.01 mol/L Tris HC1 pH 7.5，2 mmol/L β-巯基乙醇和 1 mmol/L EDTA)匀浆，10 000 r/min 离心 10 min(4℃)，取上清，用 Lowry 法测定蛋白质含量，制备成 2 mg/mL 匀浆液备用。用烟夜蛾雌蛾卵巢匀浆液和大肠杆菌 BL21 表达的

pGEX/HassCBa 重组蛋白，在 95℃水浴处理 30 s，冷却后上样进行 12%胶浓度 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后将凝胶上的蛋白质通过电转移到硝酸纤维素膜上，进行免疫印迹分析。免疫印迹方法见 1.2.8，把鼠抗 GST 单抗改换用 HassCBa 抗体。

2 结果与分析

2.1 *HassCB* 的扩增、克隆和序列测定

以烟夜蛾卵巢总 RNA 为模板，利用引物对 HassCBP1 和 HassCBP2 进行一步法 RT-PCR 扩增，产物经琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示有大小约为 1 000 bp目的条带出现（图 1），与预期一致。将目的条带纯化后，克隆至 pMD19-T 载体中，酶切和 PCR 鉴定后，对阳性克隆进行测序，获得长度为 1 017 bp 的核苷酸序列。

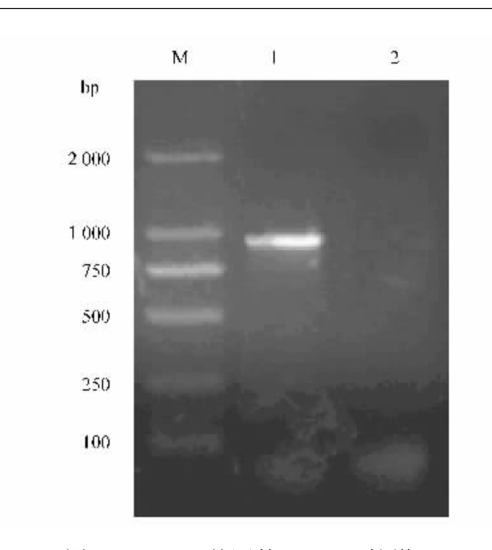


图 1 *HassCB* 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR amplification of *HassCB* gene

M：DNA 标准分子量 Molecular weight marker DL2000；
1：RT-PCR 产物 RT-PCR products of *HassCB* gene；
2：PCR 阴性对照 PCR without template.

2.3 序列分析

序列分析结果表明，*HassCB* 基因 ORF 全长 1 017 bp，编码 338 个氨基酸残基。利用生物信息学

图 2 烟夜蛾组织蛋白酶 B 酶原（CB）与其同源蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of HassCB and its homologues from other CBs

HassCB：烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（GenBank accession no. EF154237）；HarmCB：棉铃虫 *H. armigera*（GenBank accession no. AF222788）；SexiCB：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（GenBank accession no. EF068255）；BmorCB：家蚕 *Bombyx mori*（GenBank accession no. AB045595）；AaegCB：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（GenBank accession no. AY626233）. 下同 The same below.

在线工具对 HassCB 蛋白的氨基酸序列进行预测分析，结果显示，HassCB 蛋白的 N 末端预测含有长度为 21 个氨基酸残基的信号肽序列，预测去除信号肽的 HassCB 成熟蛋白的分子量为 35.5 kDa，等电点为 5.96。

使用 NCBI 中的 BLAST，搜索 HassCB 的同源蛋白，并进行氨基酸序列比对（图 2），结果表明，HassCB 与其他已知昆虫的组织蛋白酶 B 的氨基酸序列有较高的相似性，其中与 HarmCB 的一致性最高，达 99%；其次是 SexiCB，为 88%（表 1）。这在一定程度上表明，昆虫的亲缘关系越近，组织蛋白酶 B 基因的氨基酸序列相似性越高。*HassCB* 基因序列已在 GenBank 登录，登录号为 EF154237。此外，还构建了昆虫组织蛋白酶 B 的系统发育树（图 3），结果显示，HassCB 和 HarmCB 聚在一起，而 AaegCB 单独分为一支。此结果与图 2 和表 1 结果一致。

表 1　昆虫组织蛋白酶 B 氨基酸序列相似性

Table 1　Similarity of CBs from insects

	HassCB	HarmCB	SexiCB	BmorCB	AaegCB
HassCB	100%				
HarmCB	99%	100%			
SexiCB	88%	88%	100%		
BmorCB	81%	81%	79%	100%	
AaegCB	58%	58%	58%	55%	100%

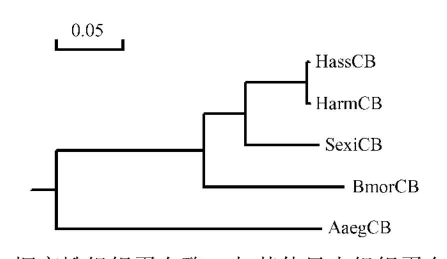


图 3　烟夜蛾组织蛋白酶 B 与其他昆虫组织蛋白酶 B 氨基酸的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CBs of insects

2.4　去掉信号肽的 *HassCBa* 在大肠杆菌中的表达与检测

将重组质粒 pGEX/*HassCBa* 进行测序鉴定，结果表明外源基因插入位置和读码框均正确。将 pGEX/*HassCBa* 质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中，经过 IPTG 诱导，SDS-PAGE 和 Western blot 检测，有大小为 60 kDa 左右的条带出现（图 4，5），由于 GST 标签的大小为 26 kDa，HassCB 成熟蛋白的预测分子量为 35.5 kDa，证明融合蛋白得到了有效表达。

2.5　表达蛋白的可溶性检测

含有 pGEX-4T-1/*HassCBa* 的 BL21(DE3)工程菌

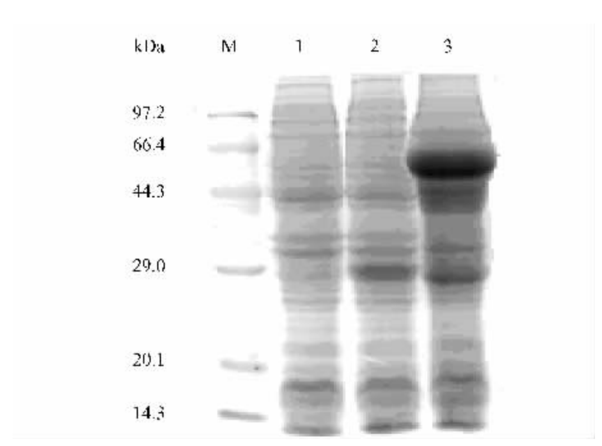


图 4　烟夜蛾组织蛋白酶 B 酶原成熟基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of the expressed product of pGEX-4T-1/*HassCBa*

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：BL21 对照 *Escherichia coli* strain BL21；2：pGEX-4T-1 转化 BL21 的表达产物 Expressed product of pGEX-4T-1；3：pGEX-4T-1/*HassCBa* 表达产物 Expressed product of pGEX-4T-1/*HassCBa*.

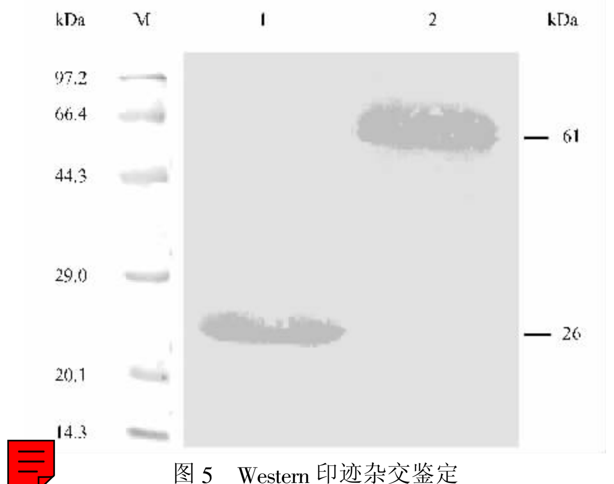


图 5　Western 印迹杂交鉴定

Fig. 5　Western blot analysis

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；
1：经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1 pGEX-4T-1 induced by IPTG；
2：经 IPTG 诱导的 pGEX/HassCBa pGEX/HassCBa induced by IPTG.

经 IPTG 诱导后，将诱导产物经溶菌酶溶解后，分别对沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 分析，发现融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中，上清液中没有目的蛋白（图 6）。

2.6　去掉信号肽的 HassCBa 抗体的制备及效价测定

利用回收的特异性表达的 61 kDa 蛋白免疫小鼠。3 次注射后取小鼠的血清获得 HassCBa 蛋白的抗血清。将抗血清经硫酸铵沉淀，最后得到了抗 HassCBa 的多克隆抗体。以表达产物 61 kDa 的蛋白为抗原，进行间接 ELISA 检测，结果表明，抗体的滴度为 1∶51 200（表 2）。

2.7　HassCBa 抗体的检测

表 2 间接 ELISA 检测 HassCBa 抗体的效价

Table 2 Detection of antibody titer of HassCBa using indirect ELISA method

抗原 Antigen	抗体稀释倍数 Dilution ratio of antibody-HRP									
	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600	51 200	102 400
重组表达 *HassCBa*	2.779	2.329	1.846	1.175	0.694	0.391	0.251	0.127	0.119	0.073
对照 CK	0.038									

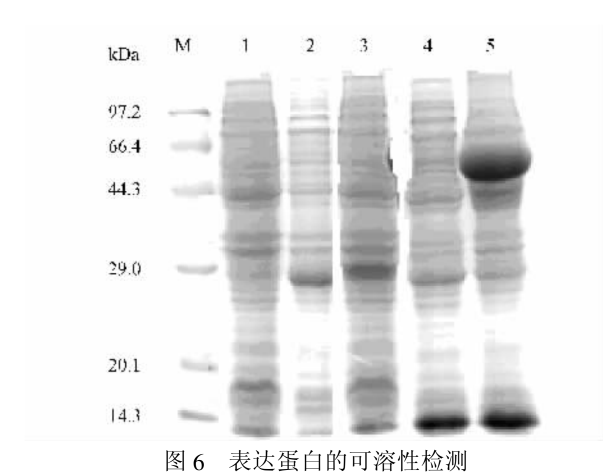


图 6 表达蛋白的可溶性检测

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the distribution of the BL21 inserted by pGEX-4T-1/*HassCBa* treatment with lysozyme

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: BL21 对照 *Escherichia coli* BL21; 2: 含有 pGEX-4T-1/*HassCB*a 菌体未经 IPIG 诱导 Non-induced cells transformed by pGEX-4T-1/*HassCBa*; 3: pGEX-4T-1 转化 BL21 的表达产物 Expressed product of pGEX-4T-1; 4: 经溶菌酶处理过的上清 Soluble protein after treatment with lysozyme; 5: 经溶菌酶处理过的沉淀 Insoluble protein after treatment with lysozyme.

用免疫印迹法检测鼠抗 HassCBa 血清对不同来源的烟夜蛾组织蛋白酶 B 的识别，结果显示(图 7)：重组表达 HassCBa 的大肠杆菌在 61 kDa 处出现一条

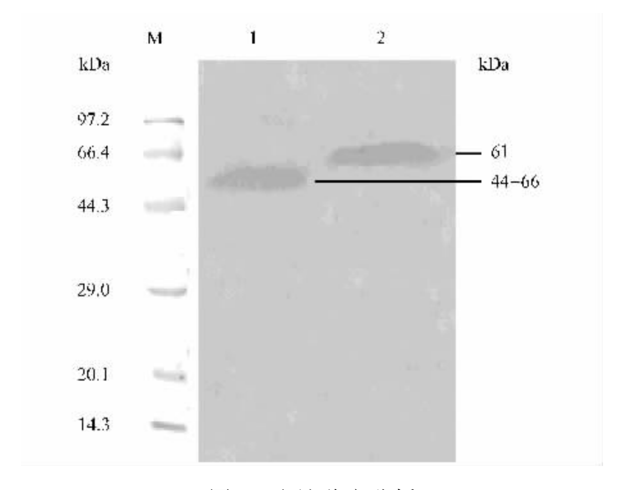


图 7 印迹鉴定分析

Fig. 7 Western blot analysis

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 烟夜蛾卵巢组织匀浆液 Homogenate from *Helicoverpa assulta* ovary; 2: 在大肠杆菌中表达的 HassCBa HassCBa expressed in *Escherichia coli*.

带，与 GST 和 HassCBa 形成的融合蛋白大小一致；在烟夜蛾卵巢匀浆液的样品中，则在 44 ~ 66 kDa 出现了一条带。说明制备的抗体不仅能够识别大肠杆菌重组表达的 HassCBa，同时也能识别烟夜蛾卵巢匀浆液中的组织蛋白酶 B。

3 讨论

关于昆虫蛋白酶基因的研究，仅在少数昆虫中有所报道，Xu 和 Kawasaki(2001)克隆了家蚕组织蛋白酶 B。杜欣军等对棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原做了大量的研究，使用基因工程方法在大肠杆菌、毕赤酵母以及杆状病毒表达系统中表达并鉴定了棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原(杜欣军等，2004; 邵红莲等，2005; 董杜鹃等，2006)。本研究从烟夜蛾卵巢中成功克隆出了含有完整 ORF 的组织蛋白酶 B 酶原基因 cDNA 片段，在多重比较时发现，HassCB 与 HarmCB 和 SexiCB 皆具有 15 个保守的半胱氨酸残基，而埃及伊蚊只有 13 个保守的半胱氨酸残基。此结果说明，保守性不是绝对的，这可能是由于昆虫不同目之间有一定差异造成的。

本研究构建了含有 *HassCB* 基因完整 ORF 序列的原核表达载体，但目的基因没有在原核中成功表达。不能表达的原因可能是组织蛋白酶 B 是溶酶体内的半胱氨酸蛋白酶，它的新生肽链是以无活性的前体肽形式合成，在穿越粗面内质网时被膜上的信号肽酶复合物切去 N 末端的信号肽，进入溶酶体而成为有活性的酶，由于原核表达过程一般不能识别真核生物分泌蛋白的信号肽断裂位点，从而影响了蛋白的表达。因此构建了去除信号肽序列的 *HassCB* 基因的表达载体 *HassCBa*，经 IPTG 诱导，SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果证明，*HassCBa* 基因得到了有效表达。此外，利用电泳目的条带作为抗原，免疫小鼠，制备了 HassCBa 蛋白的多克隆抗体，此结果为深入研究烟夜蛾 HassCB 蛋白的功能奠定了基础。

免疫印迹试验结果表明，制备的鼠抗 HassCBa 能够识别出在大肠杆菌中重组表达的 HassCBa，但

是用该抗体在识别烟夜蛾卵巢匀浆液中的组织蛋白酶 B 时，出现了一条 44 ~ 66 kDa 的带，该结果与我们预测的烟夜蛾组织蛋白酶 B 37 kDa 酶原形式或者 30 kDa 成熟形式不一致。由于组织蛋白酶 B 的结构如糖基化、磷酸化等会导致它在 SDS-PAGE 中聚合，因此推测该 44 ~ 66 kDa 的带是组织蛋白酶 B 的聚合体。安晓萌等（2004）对棉铃虫组织蛋白酶 B 的抗体进行检测，也发现一条 44 ~ 66 kDa 的带；他们采用 6 mol/L 脲处理棉铃虫卵巢匀浆液样品缓冲液后，再进行免疫印迹检测，发现聚合体减少，在 37 kDa 处出现了一条带，这与我们 HassCB 抗体检测中的情况一致。

近年的研究发现，组织蛋白酶 B 与肿瘤的发生浸润转移和细胞凋亡有密切关系（Keppler and Sloane，1996；Isahara *et al*.，1999），尤其在恶性细胞如肿瘤细胞中比在正常细胞中表达量高（Korolenko *et al*.，2002）。在诊断及治疗恶性肿瘤的研究中，组织蛋白酶 B 也将成为新的研究热点，有可能被开发成新型蛋白酶资源。此外，昆虫蛋白酶抑制剂的开发和利用，在害虫生物防治领域将会有很大的发展前景。而烟夜蛾组织蛋白酶 B 的研究可为进一步研究组织蛋白酶 B 相关基因的结构和功能奠定理论基础，从而使昆虫的组织蛋白酶和相关的蛋白酶抑制剂能够被开发成生物制剂，在害虫防治中和医学研究中得到应用。

参 考 文 献（References）

Ahn JE，Salzman RA，Braunagel SC，Koiwa H，Zhu-Salzman K，2004. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. *Insect Mol. Biol.*，13：649 – 652.

An XM，Shao HL，Du XJ，Zhao XF，Wang JX，2004. Preparation and identification of the polyclonal antibodies from recombinant cathepsin B. *Entomol. Knowl.*，41(2)：132 – 136.［安晓萌，邵红莲，杜欣军，赵小凡，王金星，2004. 棉铃虫组织蛋白酶 B 多克隆抗体制备及鉴定. 昆虫知识，41(2)：132 – 136］

Berquin IM，Sloane BF，1996. Cathepsin B expression in human tumors. *J. Adv. Exp. Med. Biol.*，389：281 – 294.

Bond JS，Butler PE，1987. Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.*，56：333 – 364.

Cho WL，Tsao SM，Hays AR，Walter R，Chen JS，Snigirevskaya ES，Raikhel AS，1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.*，274：13 311 – 13 321.

Christeller JT，Burgess EPJ，Mett V，Gatehouse HS，Markwick NP，Murray C，Malone LA，Wright MA，Philip BA，Watt D，Gatehouse LN，Lövei GL，Shannon AL，Phung MM，Watson L，Laing WA，2002. The expression of a mammalian proteinase inhibitor，bovine spleen trypsin inhibitor in tobacco and its effects on *Helicoverpa armigera* larvae. *Transgenic Res.*，11：161 – 173.

Dong DJ，Hu JD，Zhang XC，Li ZJ，Wang JX，Zhao XF，2006. Expression of *Helicoverpa armigera* cathepsin B in *Pichia pastoris*. *China Biotechnology*，26(2)：44 – 48.［董杜鹃，扈进冬，张新昌，李子劲，王金星，赵小凡，2006. 棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原在毕赤酵母中的表达. 中国生物工程杂志，26(2)：44 – 48］

Du XJ，Shao HL，Shao DD，Zhao XF，Wang JX，2004. Expression and purification of procathepsin B from *Helicoverpa armigera* in *Escherichia coil*. *J. Agri. Biotechnol.*，12(2)：162 – 166.［杜欣军，邵红莲，邵丁丁，赵小凡，王金星，2004. 棉铃虫组织蛋白酶 B 酶原在大肠杆菌中的表达及纯化. 农业生物技术学报，12(2)：162 – 166］

Felleisen R，Klinkert M Q，1990. *In vitro* translation and processing of cathepsin B of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.*，9：371 – 377.

Guo XR，Ma JS，Luo MH，Jiang JW，2000. The new progress of study *Helicoverpa assulta*. *Acta Tabacaria Sinica*，6(3)：36 – 42.［郭线茹，马继盛，罗梅浩，蒋金炜，2000. 烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（Guenée）研究新进展. 中国烟草学报，6(3)：36 – 42］

Isahara K，Ohsawa Y，Kanamori S，Shibata M，Waguri S，Sato N，Gotow T，Watanabe T，Momoi T，Urase K，Kominami E，Uchiyama Y，1999. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience*，91：233 – 349.

Keppler D，Sloane BF，1996. Cathepsin B：multiple enzyme forms from a single gene and their relation to cancer. *Enzyme Protein*，49：94 – 105.

Kestemont P，Cooremans J，Abi-Ayad A，M lard C，1999. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *Perca fluviatilis*：variations with developmental stage and spawning period. *Fish Physiol. Biochem.*，21：59 – 64.

Korolenko TA，Zhyanaeva SY，Poteryaeva ON，Falameeva OV，Levina OA，Kaledin VI，Shandula I，2002. Activity and concentration of cathepsin B as prognostic criteria for the development of mouse LS lymphosarcoma and Lewis lung adenocarcinoma. *Bull. Exp. Biol. Med.*，133：392 – 395.

Kuai XL，Xiao SD，Liu WZ，Ren WP，Tong JF，2002. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of cathepsin B. *Chinese Journal of Gastroenterology*，7(6)：335 – 337.［蒯小玲，萧树东，刘文忠，任卫平，童菊芳，2002. 组织蛋白酶 B 酶联免疫吸附测定方法的建立. 胃肠病学，7(6)：335 – 337］

Liu XG，An SH，Luo MH，Guo XR，Yuan GH，2006. Cloning and sequencing of cDNA encoding pheromone binding protein 3 from the *Helicoverpa assulta*（Guenée）and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Entomol. Sin.*，49(5)：733 – 739.［刘晓光，安世恒，罗梅浩，郭线茹，原国辉，2006. 烟实夜蛾信息素结合蛋白 3 cDNA 的克隆、序列分析与原核表达. 昆虫学报，49(5)：733 – 739］

Liu Y，Salzman RA，Rankiw T，Zhu-Salzman K，2004. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，34：1 069 – 1 177.

Sambrook J，Fritsch EF，Maniatia T，1989. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press，New York.

Shao HL，Zhao XF，Dong DJ，Hu JD，Shao DD，Yang XM，Wang JX，2005. Expression and identification of *Helicoverpa armigera* cathepsin B

in baculovirus system. *Journal of Shandong University* (*Natural Science*), 40(6): 107-111. [邵红莲，赵小凡，董杜鹃，扈进冬，邵丁丁，杨晓梅，王金星，2005. 棉铃虫组织蛋白酶B在杆状病毒表达系统中的表达及鉴定. 山东大学学报(理学版), 40(6): 107-111]

Telang M, Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, Damle A, Deshpande V, Sainani M, Ranjekar P, Gupta G, Birah A, Rani S, Kachole M, Giri A, Gupta V, 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry*, 63(4): 643-652.

Xu XL, Zhao XF, Wang JX, 2001. Distribution and biosynthesis sites of cathepsin B in *Helicoverpa armigera*. *Zoological Research*, 22(3): 242-245. [徐夏莲，赵小凡，王金星，2001. 棉铃虫组织蛋白酶B组织分布与合成部位的研究. 动物学研究, 22(3): 242-245]

Xu YS, Kawasaki H, 2001. Isolation and expression of cathepsin B cDNA in Hemocytes duting metamorhposis of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol*. B, 130: 393-399.

YamamotoY, Watabe S, Kageyama T, Takahashi SY, 1999. Purification and characterization of *Bombyx* cysteine proteinase specific inhibitors from the hemolymph of *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 42(2): 119-129.

Zhang XC, Liu Y, Wang JX, Zhao XF, 2005. Purification of an inhibitor of *Helicoverpa armigera* cathepsin B from soybean seeds. *Acta Entomol. Sin.*, 48(6): 849-853. [张新昌，刘杨，王金星，赵小凡，2005. 从大豆中纯化棉铃虫组织蛋白酶B抑制因子 HCB-Soy Ⅰ. 昆虫学报, 48(6): 849-853.]

Zhang ZH, Zhao XF, Wang JX, 2000. Research on proteinases in eggs of insects. *Entomol. Knowl.*, 37(4): 247-250. [张志宏，赵小凡，王金星，2000. 昆虫卵内蛋白酶的研究. 昆虫知识, 37(4): 247-250]

Zhao XF, Wang JX, 1996. Mechanism of activation and possible roles of the cathepsin B-like and D-like proteinases in the eggs of *Phiosamia cynthia ricini*. *Entomologia Sinica*, 3(4): 345-353.

Zhao XF, Wang JX, Wang DH, 1998. Studies on the properties of the egg proteinases in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sin.*, 41(1): 21-26. [赵小凡，王金星，王德红，1998. 棉铃虫卵内蛋白酶性质研究. 昆虫学报, 41(1): 21-26]

(责任编辑：赵利辉)